



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2012

Array-basierter Nachweis chromosomaler Aberrationen bei malignen Neoplasien

Baudis, Michael ; Giefing, M ; Cai, Haoyang ; Kumar, Nitin ; Vater, I ; Richter, J ; Siebert, R

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11825-012-0328-x>

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-76322>

Journal Article

Accepted Version

Originally published at:

Baudis, Michael; Giefing, M; Cai, Haoyang; Kumar, Nitin; Vater, I; Richter, J; Siebert, R (2012). Array-basierter Nachweis chromosomaler Aberrationen bei malignen Neoplasien. *Medizinische Genetik*, 24(2):114-122.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11825-012-0328-x>

Array-basierter Nachweis chromosomaler Aberrationen bei malignen Neoplasien

Michael Baudis¹, Maciej Giefing^{2,3}, Haoyang Cai¹, Nitin Kumar¹,
Inga Vater², Julia Richter², Reiner Siebert²

¹Institut für Molekulare Biologie
Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich
mbaudis@imls.uzh.ch

²Institut für Humangenetik
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel &
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Schwanenweg 24
D-24105 Kiel
rsiebert@medgen.uni-kiel.de

³Institut für Humangenetik
Polnische Akademie der Wissenschaften
Strzeszynska 32,
60-479 Posen
Polen

Korrespondenz-Adresse

Prof. Dr. med. Reiner Siebert
Institut für Humangenetik
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel &
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Schwanenweg 24
D-24105 Kiel
rsiebert@medgen.uni-kiel.de

Tel.: 0431-597-4701 oder -1779
Fax.: 0431-597-1841

Zusammenfassung

Array-basierte Methoden zum Nachweis chromsomalere Imbalancen haben in der vergangenen Dekade zunehmende Bedeutung in der tumorgenetischen Analytik gewonnen. Dabei werden im Wesentlichen verschiedene Array-CGH- und SNP-Array-basierte Technologien unterschieden, die je nach Fragestellung, Ausgangsmaterial und gewünschter Auflösung unterschiedliche Vor- und Nachteile zeigen. So erlauben SNP-basierte Methoden im Gegensatz zum klassischen Array-CGH-Ansatz den gleichzeitigen Nachweis von chromosomalen Imbalancen und von Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl (CN-LOH). Bei allen Array-basierten Analysen von Tumoren ist zu beachten, dass im Gegensatz zu den Analysen zum Nachweis konstitutioneller Veränderungen zumeist nicht alle untersuchten Zellen dem neoplastischen Klon oder einem chromosomal aberranten Subklon angehören. Einsatzgebiete von Array-basierten Technologien bei Tumoren sind z.B. die Charakterisierung pathogenetisch relevanter Imbalancen, die Definition von molekularen und klinischen Subgruppen von Tumoren oder die Identifizierung von Targets für eine individualisierte Therapie.

Schlüsselwörter: Array-CGH, SNP-Array, Verlust der Heterozygotie, Tumorgenetik, Chromosomale Imbalancen.

Englischer Titel, Abstract und Key Words

Array based detection of chromosomal aberrations in malignant neoplasias

During the last decade, array-based methods for the detection of genomic imbalances have gained increasing importance in the field of cancer genetics. With their particular platform-specific advantages and disadvantages, different array-CGH and SNP-array-based technologies can be utilized according to the question addressed, the material to be analyzed and the resolution targeted. In contrast to array-CGH based technologies, SNP-based arrays allow the simultaneous detection of copy-neutral loss of heterozygosity in addition to the diagnosis of chromosomal imbalances. In all array-based approaches it needs to be considered that tumors are usually a mixture of clonal neoplastic and normal cells and that some aberrations might be subclonal. Applications of array-based imbalance mapping in cancer include the characterization of pathogenetically relevant imbalances, the definition of molecular or clinical subgroups of tumors or the identification of targets for individualized therapy.

Key words: Array-CGH, SNP-Array, loss of heterozygosity, cancer genetics, chromosomal imbalances

Einführung

Der Nachweis genetischer Aberrationen gewinnt zunehmend an Bedeutung für die individualisierte Therapie maligner Tumoren. Im Focus stehen dabei somatische genetische Veränderungen, die während der Tumorentstehung von den Krebszellen erworben wurden und die auf diese beschränkt sind. Zunächst auch als Matrix-CGH bezeichnete Array-CGH Verfahren wurden ursprünglich primär zum Nachweis solcher Aberrationen in Tumoren entwickelt [8,10]. Im Folgenden sollen die Möglichkeiten und Grenzen heutiger Array-basierter Verfahren zum Nachweis genomischer Imbalancen in Tumoren diskutiert und eine kursorische Übersicht über die Imbalancemuster und deren klinische Bedeutung bei ausgewählten Tumorentitäten gegeben werden.

Methodische Erwägungen zum Einsatz Array-basierter Techniken zum Nachweis chromosomaler Imbalancen bei malignen Neoplasien

Auf die technischen Prinzipien und verschiedenen methodischen Plattformen zum Array-basierten Nachweis chromosomaler Aberrationen wird an anderer Stelle dieses Themenheftes ausführlich eingegangen. Deshalb sollen im Folgenden vorrangig diejenigen methodischen Aspekte diskutiert werden, welche besonders für die Analyse von Tumoren von Bedeutung sind.

Möglichkeiten und Grenzen des Nachweises genetischer Aberrationen in Tumoren mit Array-basierten Verfahren

Die Domäne der Array-basierten Verfahren ist der genomweite und mittel- bis hochauflösende Nachweis chromosomaler Imbalancen, d.h. von Zugewinnen und Verlusten genetischen Materials, in den Tumorzellen. Während die Anwendbarkeit der Methodik auf archivierte bzw. fixierte Gewebe eine prinzipielle Stärke des Verfahrens darstellt, können balancierte Translokationen oder intrachromosomale Rearrangements nur sehr eingeschränkt detektiert werden. Somit entgehen eine Vielzahl klassischer und diagnostisch bedeutsamer chromosomaler Aberrationen, von der Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) über andere rekurrente Translokationen bei Leukämien und Lymphomen bis hin zu den durch Genomsequenzierung zunehmend identifizierten balancierten Translokationen bei soliden Tumoren, der Detektion mit den üblicherweise angewandten Array-Formaten. Solche Aberrationen sind zwar – zumindest bei hämatologischen Neoplasien - in der Regel durch die tumorzytogenetische Analyse gebänderter Metaphase-

Chromosomen nachweisbar, diese Chromosomenbänderungsanalyse ist aber nicht auf die in der Diagnostik häufig nur zur Verfügung stehenden fixierten Gewebe anwendbar. Deshalb ist eine Kombination Array-basierter Verfahren mit der Interphase-Zytogenetik im Sinne der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis rekurrenter balancierter Chromosomenveränderungen eine häufig angewandte Variante.

Zu beachtende biologische Besonderheiten bei der Array-basierten Analyse von Tumoren im Vergleich zu Keimbahnanalysen

Maligne Tumoren sind in der Regel monoklonale, sich von einer Ursprungszelle ableitende Zellpopulationen. Allerdings können in einem Tumor durchaus mehrere genomisch unterschiedliche Subklone koexistieren, die aus einem gemeinsamen Ursprungs- klon hervorgegangen sind. Ohne Anreicherung der Tumorzellen oder einzelner Tumorzellkompartimente wird bei der Array-basierten Analyse somit primär ein Gemisch von normalen, nicht neoplastischen Zellen und Tumorzellen bzw. Tumorzellsubklonen analysiert. Ist die Anzahl der Zellen mit einer Aberration zu gering, sei es aufgrund eines geringen Tumorzellgehaltes des Gewebes oder aufgrund der Beschränkung der Aberration auf einen Subklon, kann diese Veränderung der Detektion entgehen. Macht ein zu untersuchender Klon weniger als 30-50% des Zellgehalts aus sollte eine Anreicherung dieser Zellen z.B. per immunologischer Zellsortierung (i.e. MACS, FACS) oder Mikrodissektion erwogen werden. Zudem sollte der Tumorzellgehalt (bzw. Gehalt an Zellen mit einer definierten Aberration) auch in die Interpretation der experimentellen Befunde z.B. beim Abschätzen der Kopienzahl einer Amplifikation Eingang finden.

Die klonale Natur der analysierten Zellen muss zudem bei der Interpretation von Kopienzahlvarianten (CNVs) bedacht werden. Wie auch bei der Analyse von Keimbahn-DNA werden bei der Untersuchung von Tumor-DNA konstitutionelle Kopienzahlvarianten sowohl im Sinne von Polymorphismen als auch von pathogenen Imbalancen detektiert. Diese müssen von somatischen Aberrationen unterschieden werden. Dabei können konstitutionell und somatisch dieselben Genorte deletiert sein, wie z.B. das *SMARCB1*-Gen beim Rhabdoid-Tumor-Prädispositions-Syndrom (RTPS), und sich ggfls. das Muster konstitutioneller und somatischer Aberration im Array-Profil addieren. Darüber hinaus können in der konstitutionellen Analyse als polymorphe CNVs gewertete Aberrationen bei der somatischen Analyse von Tumorzellen diagnostische Bedeutung bekommen. So werden Imbalancen im Bereich der T-Zell-Rezeptor (*TCR*)- oder Immunglobulin (*IG*)-Genorte in der konstitutionellen Analyse in der Regel als CNV gewertet. Bei der Analyse von Tumoren des lymphatischen Systems haben aber in der Regel alle klonalen Zellen dasselbe

Rearrangement eines oder mehrerer dieser Genorte, einhergehend mit Verlusten genomischen Materials durch die Rearrangements. Diese Muster können zur Klonalitätsbestätigung, Bruchpunktkartierung und Verlaufskontrolle herangezogen werden [7].

Schließlich muss bedacht werden, dass Tumorzellgenome häufig nicht diploid sind. Bei hyperploiden Genomen führen einfache Zugewinne oder Verluste nicht zu ähnlichen starken Ausschlägen der genomischen Profile wie bei diploiden Genomen, was im Kontext des Tumorzellgehaltes zusätzlich die Detektion limitieren kann. So führt ein einfacher Zugewinn bzw. Verlust genomischen Materials theoretisch bei 100% Tumorzellgehalt in einem diploiden Tumorgenom zu einer Ratio von 3:2 (also 150%) bzw. 1:2 (also 50%), bei einem tetraploiden Tumorgenom aber nur zu einer Ratio von 5:4 (also 125%) bzw. 3:4 (also 75%). Entsprechend fallen die Profilausschläge im tetraploiden Tumorgenom geringer aus.

Kopienzahl-neutraler Verlust der Heterozygotie bzw. partielle uniparentale Disomie in Tumoren

Basierend auf Arbeiten der Gruppe um Bryan Young zu akuten Leukämien ist der Nachweis (partieller) uniparentaler (Iso)Disomien (pUPD) mittels SNP-sensitiver Array-Technologien in der tumorgenetischen Analyse von diagnostischem Interesse [9]. Im Prinzip geht es hierbei um den Array-basierten Nachweis von Verlusten der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) ohne eine Deletion, was durch z.B. eine Duplikation des verbleibenden Allels bedingt ist. Auch wenn das Konzept dieses Kopienzahl-neutralen LOH schon alt und ein bekanntes Prinzip der Tumorsuppressor-Gen-Inaktivierung ist, so hat es durch den Nachweis mittels Array-Technologie im Vergleich zur ursprünglichen Anwendung von RFLP- oder Mikrosatellitenmarkern erheblich an Interesse gewonnen. Prinzipiell ist der Nachweis von pUPD/Kopienzahl-neutralem LOH (beide Begriffe meinen dasselbe) mit allen SNP-basierten Array-Plattformen möglich. Optimaler Weise werden die Allelzustände und Kopienzahl in Keimbahn und Tumorgewebe miteinander verglichen. Solche genomischen Regionen, bei denen SNPs in der Keimbahn heterozygot und im Tumorgewebe homozygot sind werden entsprechend als LOH bezeichnet, ist die Kopienzahl zudem in beiden Geweben identisch, handelt es sich um Kopienzahl-neutralen LOH. Liegt keine Analyse korrespondierender Keimbahn-DNA vor, ist auch über die Anwendung bioinformatischer Algorithmen eine Abschätzung möglich, ob eine (langstreckige) Region von pUPD vorliegt. Dazu wird anhand von Referenzdaten die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass mehrere chromosomal benachbarte SNPs zufällig homozygot sind. Wenn die Zahl der homozygoten SNPs in einem solchen Bereich eine bestimmte Zahl übersteigt und ist dieser genomisch balanciert, ist dies

allein aufgrund des Zufalls unwahrscheinlich und es wird eine pUPD detektiert. Allerdings ist hierbei zu bedenken, dass auch konstitutionell solche pUPD Regionen vorkommen, die insbesondere bei Kindern konsanguiner Eltern durchaus beachtliche Größe annehmen können, warum zumeist allein aufgrund der Analyse von Tumor-DNA keine pUPD Regionen unter einer Größe von 5Mb diagnostiziert werden. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass solche Berechnungen ohne die Analyse der Keimbahn-DNA stark von Laboreffekten, DNA-Qualität und der Auswahl der herangezogenen Kontrollen abhängen kann. Auch Amplifikationen eines Allels können einen LOH ohne Deletion suggerieren, weil das nicht amplifizierte Allel nicht (mehr) ausreichend detektiert wird. Veränderungen der Ploidie schließlich kann über Veränderungen der Allelverteilung (z.B. 2:1 bzw. 1:2 bei Triploidie statt 1:1 bei Diploidie) zu analytischen Problemen führen, wobei die Bestimmung der Allel-spezifischen Kopienzahlen bereits in einigen Analyseprogrammen implementiert ist.

Überlegungen zur Auswahl von Array-Plattformen für die jeweilige Analyse

Die Auswahl der „optimalen“ Array-Plattform für eine geplante tumorgenetische Analyse richtet sich wesentlich nach der zu bearbeitenden Fragestellung, der für diese Fragestellung notwendigen Auflösung und dem verfügbaren Ausgangsmaterial (Abbildung 1). Nicht jede Plattform, die in der konstitutionellen Analytik etabliert ist, eignet sich auch für die Untersuchung von Tumoren, weil insbesondere Veränderungen der Ploidie und der Tumoren inhärente Mosaikstatus (i.e. Mischung von klonalen und nicht-neoplastischen Zellen) durch die der Auswertung zugrunde liegenden Algorithmen nicht ausreichend betrachtet werden. Prinzipiell müssen Plattformen ohne (klassische Array-CGH) und mit SNP-Detektion (SNP-Arrays) unterschieden werden, wobei erstere nur Imbalancen detektieren können, letztere Imbalancen und LOH.

Array-CGH Plattformen: Für Array-basierten Kopienzahl-Analysen von Tumoren finden heute im Wesentlichen Arrays mit langen (>50bp) Oligonukleotiden (z.B. Agilent, NimbleGen, BlueGnome) bzw. BAC/PAC-Arrays Anwendung. Während viele Pionier-Arbeiten im Bereich der Array-Analyse von Tumoren 3K BAC/PAC oder Tiling-BAC/PAC Arrays quasi als „Standardformat“ verwendeten, ist heute die Zahl der Oligonukleotide und damit die Abdeckung und Auflösung mehr oder minder frei wählbar (Abbildung 1A-C) [4,7]. Zum Teil werden spezifisch Arrays angeboten, die in tumorgenetisch relevanten Regionen eine höhere Zahl von Oligonukleotiden/Klonen haben. Für die hochauflösende Kartierung von fokalen Imbalancen oder Bruchpunkten sind (custom-made) Tiling-Arrays beziehbar [4]. Bei all diesen Ansätzen ist zu bedenken, dass die funktionelle Auflösung der Arrays in der Regel nicht der physikalischen entspricht, da zumeist die Information mehrerer

Oligonukleotide/Klone für den Nachweis einer Imbalance integriert werden muss. Die pure Zahl der Proben auf dem Array oder die Abdeckung bestimmter Regionen sagt somit nicht notwendigerweise etwas über die funktionelle Auflösung aus. Gerade bei qualitativ limitierter Untersuchungs-DNA, z.B. aus Paraffin-Gewebe oder von mikrodisssezierten Zellen, kann die Varianz der Hybridisierungssignale sehr groß sein. Deshalb favorisieren einige Autoren für diese Anwendungen die Nutzung von BAC/PAC-Arrays, da hier die größere Hybridisierungsfläche der BAC/PAC Klone methodenimmanent für lokale Variationen in der Hybridisierungseffizienz korrigiert. Insgesamt ist somit gerade bei Analysen mit minderer DNA-Qualität die funktionelle Auflösung wesentlich und sollte im Vorfeld experimentell z.B. an Normalgeweben ähnlichen Ursprungs und identischer Aufarbeitung bestimmt werden. Dabei ist auch die Qualität der eingesetzten Kontroll-DNA zu berücksichtigen. Wenn diese anders extrahiert oder markiert wurde, kann dies zu erheblichen Änderungen der Profile führen z.B. in GC-reichen Regionen. Zumeist ist es empfehlenswert, die Kontroll-DNA identisch wie die Tumor-DNA zu präparieren.

SNP-Array Plattformen: Für die Array-basierte Detektion von SNPs wurden inzwischen eine Reihe verschiedener Techniken entwickelt (Abbildung 1D). Sämtlich sind in der Lage, zuverlässig auch Imbalancen zumindest in hochmolekularer DNA zu identifizieren, wobei die zugrunde liegenden Algorithmen sich bis hin zur Generierung der zur Berechnung notwendigen Kontroll-Daten deutlich unterscheiden. Aus Platzgründen kann hier nicht detailliert auf alle Aspekte eingegangen werden.

Eigene Erfahrungen zeigen, dass die Restriktionsverdau-basierten Zweifarb-Hybridisierungen auf lange Oligonukleotidarrays (z.B. Agilent, BlueGnome) insbesondere bei hyperploiden Klonen und DNA aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben deutliche Limitationen in der tumorgenetischen Analyse zeigen. Kurze (<30bp) Oligonukleotidarrays (Affymetrix) werden breit angewandt und sind sowohl zur Kopienzahl- als auch LOH-Bestimmung an qualitativ ausreichender DNA gut geeignet. Da es sich hierbei um eine Einfarbhybridisierung handelt ist die Verfügbarkeit eines Labor-internen Kontroll-Datensatzes zur Berechnung von Veränderungen nach unseren Erfahrungen sehr hilfreich zur Verbesserung der funktionellen Auflösung, auch wenn prinzipiell zahlreiche Algorithmen ohne diese Labor-internen Kontrollen angewandt werden können. Inter-Labor-Vergleiche zeigen eine z.T. erhebliche technische Varianz z.B. bedingt durch unterschiedliche Amplifikationseffizienzen im Markierungsprotokoll; diese haben aber bei entsprechender bioinformatischer Prozessierung und Labor-internen Kontrollen z.T. wenig Einfluss auf die biologische Interpretation. Die Anwendung dieser Arrays auf FFPE-Material ist nur in sehr wenigen Publikationen dokumentiert und nach eigenen Erfahrungen nur in einzelnen Fällen informativ. Auch die BeadArray Technologie (Illumina) findet zunehmend Anwendung für die

molekulare Karyotypisierung von Tumoren. Die Analyse von FFPE-Material scheint hiermit ebenfalls möglich. Erst kürzlich eingeführt spezifisch für die Analyse von FFPE-Material wurden Arrays basierend auf der Anwendung von Molecular Inversion Probes (MIP-Arrays), welche aber bislang nur als Custom-Service verfügbar sind (Affymetrix). Die Konkordanz mit langen Oligonukleotidarrays zur Bestimmung von genomischen Imbalancen ist nach eigenen Erfahrungen gut. Aus prinzipiellen Erwägungen ist die gleichzeitige Detektion von Imbalancen und LOH bei Tumoren den reinen Kopienzahl-Arrays überlegen. Allerdings ist die Anwendung von SNP-Arrays auf FFPE-Material und DNA aus mikrodissezierten Zellen schwieriger als aus Frischmaterial, aber dennoch zunehmend möglich.

Anwendungen des Array-basierten Nachweises genomischer Imbalancen bei malignen Neoplasien

Die Analyse von Tumoren war historisch der Ausgangspunkt für die Entwicklung Matrix- bzw. Array-basierter Methoden zum genomweiten Nachweis chromosomaler Imbalancen durch die Arbeitsgruppen von Peter Lichter bzw. Dan Pinkel [8,10]. Inzwischen sind Datensätze von über 42.000 Array-basierten Analysen in Tumoren verfügbar (siehe <http://www.arraymap.org>) [2,3]. Das Spektrum der Anwendungen und Fragestellungen ist breit. Im Folgenden seien exemplarisch einige Beispiele genannt

Charakterisierung pathogenetisch relevanter Imbalancen: Durch die Analyse fokaler, d.h. in der physikalischen Größe begrenzter Zugewinne und Verluste wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von Kandidatengen identifiziert, die in die Pathogenese bestimmter Tumorentitäten involviert sind [7]. Beispiele sind fokale Deletionen von Genen der B-Zell-Differenzierung in akuten lymphatischen Leukämien, fokale Imbalancen von Genen des *NFκB*-Signalweges bei Hodgkin-Lymphomen oder fokale Deletionen von Chromatin-modifizierenden Genen in verschiedenen hämatopoetischen und soliden Tumoren.

Definition von molekularen Subtypen von Erkrankungen: Innerhalb von histopathologisch homogen erscheinenden Gruppen von Tumoren konnten durch Array-basierte Analysen unterschiedliche Muster chromosomaler Imbalancen identifiziert werden [5,6]. Beispielhaft seien hier die Unterschiede im Muster der Zugewinne und Verluste bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen vom GCB und ABC-Subtyp genannt. In Medulloblastomen haben jüngste genomische Studien maßgeblich zum Verständnis dieser Diagnose als Sammlung unterschiedlicher Entitäten mit zugrundeliegenden definierten molekularen Mechanismen beigetragen.

Identifizierung von prognostisch relevanten Imbalancen: Durch hochauflösende Array-basierte Studien konnte gezeigt werden, dass wiederkehrende Imbalancen prognostische Bedeutung besitzen. Beispielhaft seien die mit einer ungünstigen Prognose assoziierten Deletionen im Bereich des *CRLF2*-Gens bei akuten lymphatischen Leukämien und des *CDKN2A*-Gens bei verschiedenen Lymphomen und Leukämien genannt.

Identifizierung von therapeutischen Targets: Amplifikationen von Onkogenen können prädiktiv für das Ansprechen auf bestimmte Therapien und somit für die Therapiestratifizierung sein. Amplifikationen von Genen der *HER*- oder *EGFR*-Familien und zunehmend auch anderer Onkogenfamilien identifizieren potentielle Therapietargets und helfen zum Verständnis der Mechanismen der Therapieresistenz.

Kartierung und Klonierung von Translokationsbruchpunkten: Die Grenzen von Zugewinnen und Verlusten chromosomalen Materials sind bei unbalancierten Translokationen hinweisend auf die Bruchpunkte. Doch auch bei primär balancierten Bruchpunkten können Array-basierte Verfahren zur Charakterisierung hilfreich sein. Dies kann zum einen durch Mikrodisektion und Array-Hybridisierung der derivativen Chromosomen erfolgen. Zum anderen, z.B. bei *IG*- und *TCR*-Translokationen kann die Charakterisierung der somatischen Rearrangements dieser Loci gefolgt von PCR-Verfahren wie der LM-PCR zur Klonierung der Partner führen. Dieser Ansatz wurde z.B. erfolgreich zur Charakterisierung von Translokationen in T-Zell-Neoplasien eingesetzt [4]. Eine noch nicht vollends geklärte Frage der tumorgenetischen Grundlagenforschung ist der Einfluss spezifischer genomischer Strukturelemente (z.B. repetitive Sequenzelemente) auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens genomischer Rearrangements wie z.B. Translokationen. So mögen Variationen in der Kopienanzahl (CNVs) auch in Tumoren Einfluss auf die Entstehung eines Teils der klonalen genomischen Imbalancen haben.

Klonale Evolution und Verlaufskontrolle: Durch Analyse von sequentiellen Tumorproben desselben Patienten konnten neue Einblicke in die klonale Evolution von Tumoren gewonnen werden. Auch mikrodisezierte zirkulierende Tumorzellen und Metastasen konnten im Vergleich zum Tumorgewebe analysiert und die Mechanismen der Metastasierung so besser beschrieben werden. Schließlich kann im diagnostischen Kontext der Vergleich von zwei Tumoren desselben Patienten Aufschluss darüber geben, ob es sich um eine Zweitneoplasie oder ein Rezidiv handelt.

Imbalancemuster bei verschiedenen Tumorentitäten

Genomische Imbalancen finden sich in der weit überwiegenden Anzahl maligner Neoplasien und in vielen prämaligen Läsionen. Im Durchschnitt sind mehr als 13% eines Tumorgenoms von diesen Veränderungen betroffen, wobei diese in Anzahl, Ausdehnung und Rekurrenz sehr stark zwischen Tumorentitäten, aber auch individuellen Neoplasien, variieren (Abbildung 2A) [1,2,3].

In den bisherigen Untersuchungen genomischer Imbalancen hat sich das Augenmerk stark auf die Analyse lokaler "hot spots" bzw. „fokaler Aberrationen“ gerichtet, also der minimalen und besonders häufig betroffenen Genomregionen. In der Tat weisen – wie oben beschrieben - diese Bereiche zum Teil auf pathophysiologisch relevante Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Veränderung der Anzahl der genomischen Kopien hin (siehe unten). Andererseits betreffen die ausgedehnten Veränderungen, welche in der Mehrzahl insbesondere der soliden Tumoren beobachtet werden, potentiell tausende von Genen. Da die Muster dieser oft von einigen Megabasen bis zu kompletten Chromosomenarmen reichenden, grossen Imbalancen eine relative Spezifität für einzelne Tumorentitäten zeigen, kann man grundsätzliche Selektionsvorteile im jeweiligen zellulären Kontext vermuten.

Muster chromosomaler Imbalancen bei hämatologischen Neoplasien

Bei hämatologischen Neoplasien (Leukämien, Lymphomen und anderen klonalen Erkrankungen hämatopoietischer Zellen) finden sich zwei grundsätzliche Varianten genomischer Imbalancemuster (siehe Abbildung 2B):

Insbesondere in hämatologischen Neoplasien deren maligne Transformation durch chromosomale Translokationen in hämatopoietischen Vorläuferzellen (z. B. *PML-RARA*, *BCR-BAL*, *TEL-AML1*) oder während Rekombinationsereignissen der variablen Antikörper- bzw. Rezeptormoleküle (z. B. *HOX11-TCRA/D*, *MYC-IG*) initiiert werden, finden sich häufig nur sehr wenige Imbalancen. Diese sind dann zudem oft fokale Aberrationen pathogenetisch relevanter Gene, die z.B. bei der akuten lymphatischen Leukämie wesentliche Gene der B-Zell-Entwicklung betreffen. Dieses Muster spricht insgesamt für die Annahme, dass hier nur wenige Aberrationen zur Pathogenese ausreichen (Oligo-Hit-Tumorigenese).

Im Gegensatz dazu stehen hämatologische Neoplasien mit komplexen Mustern an Zugewinnen und Verlusten, wie sie in myelodysplastischen Syndromen, vielen Lymphomen und Multiplen Myelomen beobachtet werden. Interessanterweise betreffen dabei insbesondere genomische Zugewinne immer wieder solche Onkogene, die Partner aktivierender Translokationen in hämatologischen Neoplasien sein können (z.B. *MYC*, *BCL2*,

BCL6). Zudem ergeben sich zunehmend Hinweise darauf, dass in den genannten Neoplasien, deren Inzidenz signifikant mit dem Alter zunimmt, auch die Komplexität genomischer Veränderungen einen Alters-assoziierten Anstieg zeigt. Dies legt eine Alters-assoziierte „Multi-hit-Pathogenese“ dieser Neoplasien nahe und eröffnet neue Fragen der Alters-abhängigen Veränderungen der DNA-Reparatur und der klinisch-prognostischen Bedeutung chromosomaler Marker im Kontext des Alters [5].

Rekurrente, prognostisch bedeutsame Imbalancen betreffen z.B. den *TP53* und den *CDKN2A*-Genort. Bei der chronisch lymphatischen Leukämie findet sich im Wesentlichen das aus FISH-Analysen gut bekannte Muster an Zugewinnen und Verlusten, wobei z.B. die prognostische Bedeutung von Deletionen in 13q14 neu diskutiert wird, da mittels Array-basierten Analysen neben Deletionen im Bereich der miRNA Gene *miR15/miR16* eine zweite Klasse von prognostisch wohl ungünstigeren, weitaus größeren Deletionen unter Beteiligung des *RB1*-Gens identifiziert wurde.

Muster chromosomaler Imbalancen bei soliden Tumoren

Neben chromosomalen Regionen, welche in nahezu allen Neoplasien betroffen sein können (bspw. Zugewinne des langen Armes von Chromosom 8, mit minimal zugewonnenen Regionen im Bereich des *MYC*-Genortes), weisen die verschiedenen Tumorentitäten insgesamt charakteristische Kombinationen genomischer Imbalancen auf (Abbildung 3). Beispielsweise ist bei kolorektalen Karzinomen der dort spezifische Zugewinn von 13q häufig mit einem Zugewinn von 8q kombiniert, während sich bei Mammakarzinomen neben weiteren Imbalancen oft die Kombination von Zugewinnen in 1q und 8q findet. Darüber hinaus zeigen sich fokale Aberrationen, wie Deletionen von *CDKN2A* in 9p (Abbildung 4A) oder Zugewinne in *CCND1* (Abbildung 4B), und Subtyp-spezifische Unterschiede im Imbalance-Muster, wie z.B. zwischen Mikrosatelliten-stabilen und –instabilen Kolonkarzinomen oder in histologischen Subtypen von Ösophaguskarzinomen (Abbildung 4B,C). Die prognostische Bedeutung von Imbalancen sollte deshalb immer innerhalb molekularer Gruppen und unter Berücksichtigung der jeweiligen klinischen Parameter und jeweiligen Therapie gewertet werden. Eine ausführliche Darstellung von chromosomalen Imbalancemustern bei soliden Tumoren ist hier nicht möglich, hier sei auf eine früher publizierte Übersicht zu wiederkehrenden Aberrationen und betroffenen Genen verwiesen [1].

Ausblick

Der Array-basierte Nachweis chromosomaler Imbalancen ist inzwischen ein Standardverfahren in der tumorgenetischen Forschung. In verschiedenen Europäischen Ländern wird die Array-basierte Analytik zudem in der Routine-Diagnostik insbesondere hämatologischer Neoplasien eingesetzt. Obwohl hier klinischer Informationsgehalt und Kosten durchaus den klassischen Verfahren der tumorzytogenetischen Diagnostik gegenüber zumindest ebenbürtig erscheinen, ist eine Einführung in den Leistungskatalog der gesetzlichen und privaten Kassen bisher nicht erfolgt. Da die Auflösung im Vergleich zur konventionellen Chromosomenanalyse zur Detektion von Imbalancen durchaus höher und die Genom-weite Analyse im Vergleich zur FISH deutlich informativer ist, bietet die Array-basierte Analytik gerade für die Planung individualisierter Therapieregime eine komplementäre Option. Allerdings liefert die komplette Sequenzierung von Tumorgenomen mittels Hochdurchsatz-Sequenzier-Verfahren die Informationen, die Array-basierte Verfahren generieren, neben der eigentlichen Sequenzinformation „quasi nebenbei“ mit (Abbildung 1E). Dabei sind die Imbalance-Profile hochauflösender (letztlich auf die einzelne Base), als die eines Arrays (determiniert auf ein Oligonukleotid) technologisch überhaupt sein können. Somit wird der Einsatzbereich der Array-basierten Diagnostik in der Tumorgenetik im Spannungsfeld von Auflösung, Informativität (auch unerwünschter Informativität von Sequenzierung) und Kosten determiniert werden müssen. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass zumindest mittelfristig hochauflösende genomische Arrays als etablierte und effiziente Methode einen starken Bedeutungsgewinn im Rahmen der individualisierten Therapieauswahl erfahren können.

Danksagungen

Die Autoren bedanken sich bei allen Kolleginnen und Kollegen, deren Arbeiten im Bereich der Array-basierten Analyse von Tumoren aufgrund von Platzbeschränkungen nicht zitiert werden konnten und die Array-basierte Daten zu <http://www.arraymap.org> beigetragen haben, auf denen die Abbildungen 2-4 dieser Arbeit beruhen. Die Analysen, auf denen Abbildung 1 beruhen, erfolgten z.T. in Kooperation mit Dr. Jose Ignacio Martin-Subero (Kiel/Barcelona), Dr. R. de Leeuw (Vancouver) und Dr. Matthias Schlesner (DKFZ). Die eigenen Arbeiten der Autoren im Bereich der Array-basierten Analyse von malignen Neoplasien wurden gefördert von der Deutschen Krebshilfe, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Krebshilfe Schweiz, FEBS, Polish Ministry of Science and Higher Education und der KinderKrebsInitiative Buchholz/Holm-Seppensen.

Referenzen

1. Baudis M (2007) Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer* 7: 226
2. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Tabernero J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 463: 899-905
3. Cai H, Kumar N, Baudis M. arrayMap: A Reference Resource for Genomic Copy Number Imbalances in Human Malignancies. *arXiv:1201.2677 [q-bio.GN]*
4. Dittmann K, Przybylski GK, Grabarczyk P, Dölken G, Gesk S, Siebert R, Schmidt CA (2012) Fast approach for clarification of chromosomal aberrations by using LM-PCR and FT-CGH in leukaemic sample. *Acta Haematol.* 127: 16-19
5. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW, Burkhardt B, Szczepanowski M, Salaverria I, Hummel M, Loeffler M, Pellissery S, Woessmann W, Schwänen C, Trümper L, Wessendorf S, Spang R, Hasenclever D, Siebert R; for the Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe (2012) Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 119: 1882-1887
6. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Bäcklund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 123: 473-484
7. Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA, Siebert R, Climent J, Fresquet V, Beltran E, Agirre X, Marugan I, Marín M, Rosenwald A, Sugimoto KJ, Wheat LM, Karran EL, García JF, Sanchez L, Prosper F, Staudt LM, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA

(2007) Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. Blood 109: 271-280

8. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet 20: 207-211.

9. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, Lister TA, Young BD (2005) Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. Cancer Res 65: 375-378.

10. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer.20: 399-407.

Internet Ressourcen

arrayMap: Oncogenomic array data (www.arraymap.org)

Progenetix: Cancer genome data from CGH experiments (www.progenetix.org)

Glossar

(array) CGH	(Array basierte) "Comparative Genomic Hybridization" / Vergleichende genomische Hybridisierung. Als Überbegriff schliessen wir dabei auch diejenigen Techniken mit ein, bei welchen lediglich ein Typ von DNA (Tumor oder Referenz) pro Array hybridisiert wird, und der "Vergleich" mittels bioinformatischer Verfahren zwischen Datensätzen durchgeführt wird.
CNV	"Copy Number Variation": Vererbte Variante in der Kopienanzahl meist kleiner (<1Mb) genomischer Regionen, welche als rekurrentes Phänomen in der gesunden Population beobachtet wird
(S)CNA	"(Somatic) Copy Number Abnormality": In der neoplastischen Transformation entstandene regionale genomische Imbalance

Legenden zu den Abbildungen

Abbildung 1:

Imbalance-Muster des Chromosoms 12 der Hodgkin-Lymphom-Zell-Linie L1236 analysiert auf verschiedenen Plattformen in der historischen Entwicklung. Die Anordnung der Proben (X-Achse) entspricht in den verschiedenen Analysen nicht notwendigerweise der physikalischen Position bzw. basiert auf verschiedenen Genom-Versionen. Dies erklärt die nicht immer identisch erscheinende Position der Imbalancen in den Darstellungen.

Abbildung 2:

A) Komplexität genomischer Imbalancen in verschiedenen Neoplasien, dargestellt durch von Imbalancen betroffenen Anteil der jeweiligen Tumorgenome. Die horizontale Linie zeigt den aus allen Arrays ermittelten Durchschnittswert (13,2%). Die Boxplotgraphik beruht auf einer Bestimmung der von Imbalancen betroffenen Regionen verschiedener Tumorentitäten, basierend auf 22699 qualitätskontrollierten genomischen Arrays des "arrayMap"-Projektes (www.arraymap.org). Diese Daten wurden auch für die folgenden Abbildungen genomischer Imbalanceprofile verwendet. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die individuellen Experimente in der jeweiligen Tumorkategorie.

B) Genomische Imbalancemuster in hämatologischen Neoplasien. Die Histogramme zeigen die Häufigkeit von regionalen Zugewinnen (Duplikationen, Amplifikationen; gelb) und Verlusten (Deletionen eines oder mehrerer Allele; blau). In akuten Leukämien (ALL und AML) finden sich sehr selten ausgedehnte Imbalancen. Rekurrente Deletionen bzw. Zugewinne sind zumeist sehr klein und betreffen oft Regionen zytogenetischer Rekombinationen oder pathogenetisch relevante Gene. Bei chronisch lymphatischen Leukämien (CLL; Profil 3) finden sich in Untergruppen einzelne Imbalancen, welche z.T. mit bekannten prognostischen Gruppen assoziiert sind (z.B. +12, -13q). In malignen B-Zell Lymphomen finden sich wiederum Imbalancemuster mit sowohl fokalen Veränderungen als auch einem komplexen Aneuploiditätsmuster (letzteres insbesondere in malignen Myelomen; letztes Profil). Die Zahlen bei den Diagnosen geben die Anzahl der für die Analyse verfügbaren, qualitätskontrollierten Arrayprofile an (* bei grösserer Anzahl wurden jeweils 300 Datensätzen aus den Ausgangsdaten randomisiert).

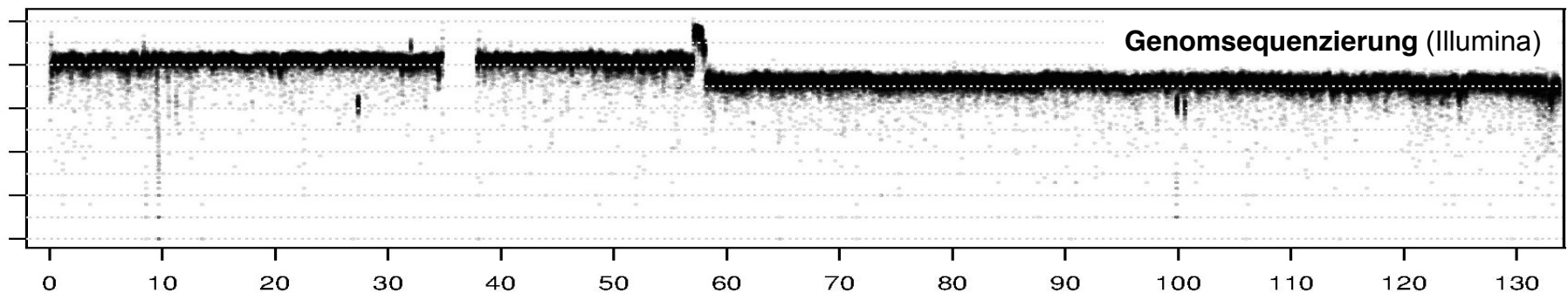
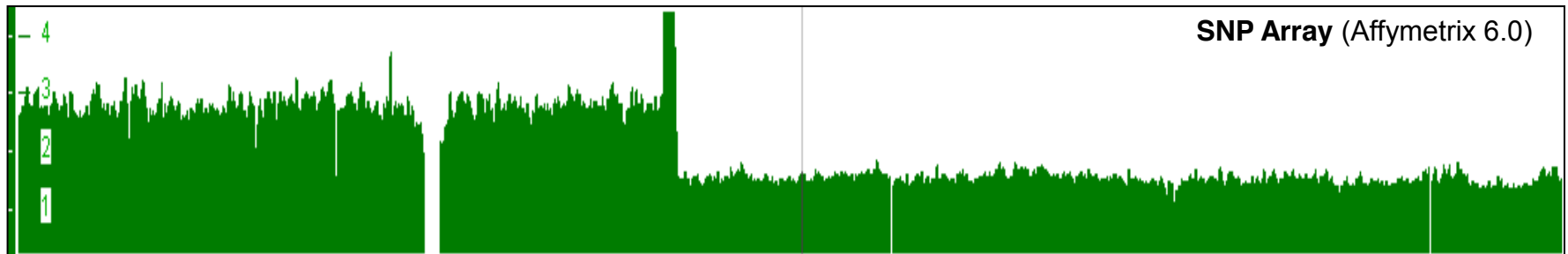
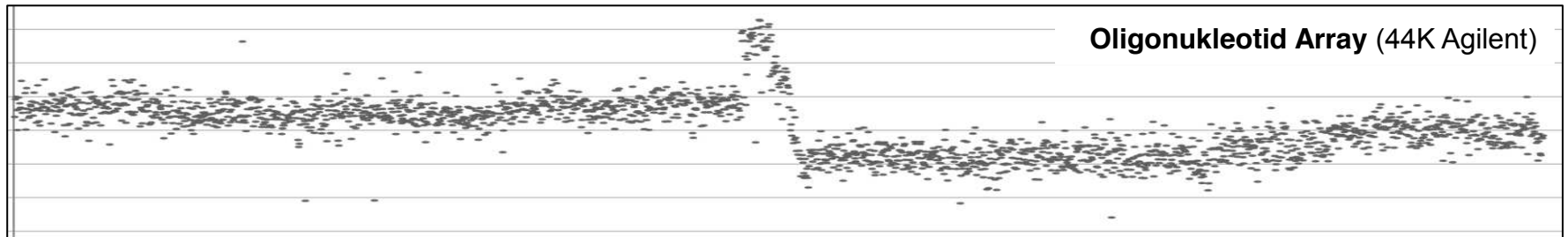
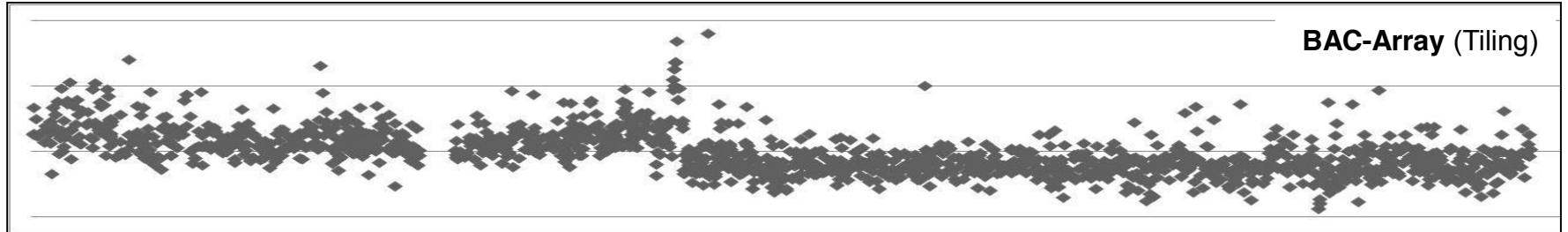
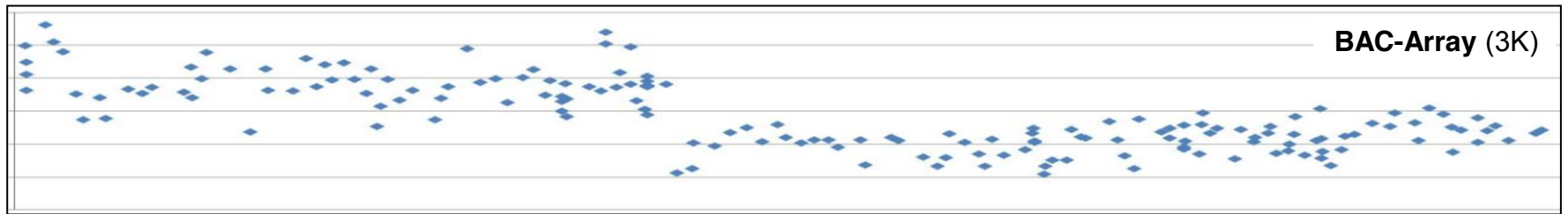
Abbildung 3: Regionale Verteilung genomischer Imbalancen für ausgewählte Karzinomentitäten. Die Abbildung verdeutlicht, dass in soliden Tumoren bestimmte rekurrente genomische Imbalancen in verschiedenen Entitäten beobachtet werden können

(bsp. +1q; +7, -8p/+8q; -13q), während andere Imbalancen typisch für einzelne Neoplasien sind (bspw. Zugewinn von Chromosom 13q in kolorektalen Adenokarzinomen oder Deletionen von 3p in Nierenzellkarzinomen). Die Zahlen bei den Diagnosen geben die Anzahl der für die Analyse verfügbaren, qualitätskontrollierten Arrayprofile an (* bei grösserer Anzahl wurden jeweils 300 Datensätzen aus den Ausgangsdaten randomisiert). Farbschema wie in Abbildung 2B.

Abbildung 4 Fokale Aberrationen und unterschiedliche Muster chromosomaler Imbalancen in Tumoren desselben Organsystems

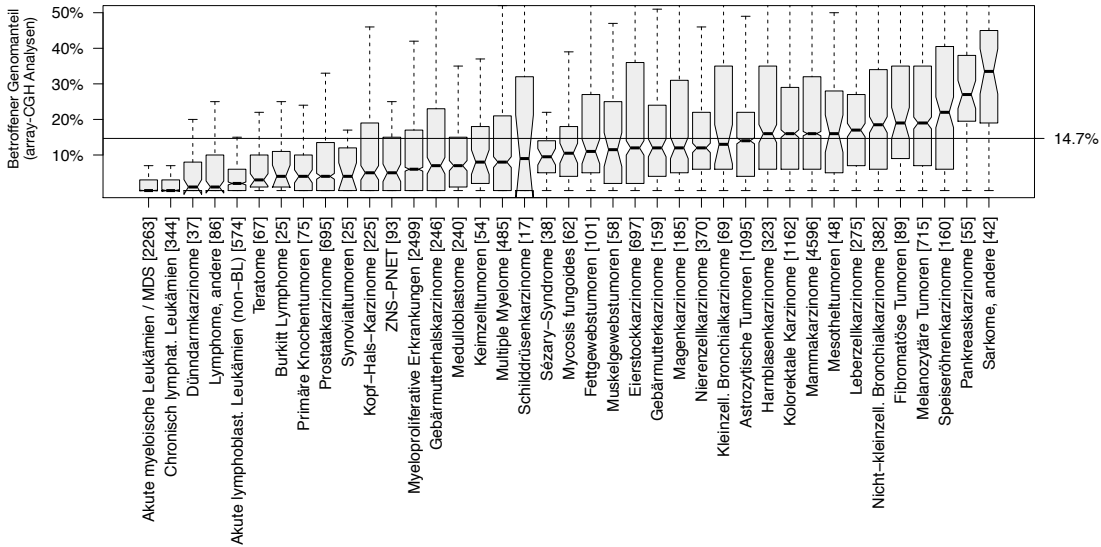
A) In Glioblastomen kann durch hochauflösende Array-Techniken die fokale Deletion der CDKNA/B-Region auf 9p wesentlich besser charakterisiert werden als es mit chromosomalen Techniken möglich war (siehe Pfeil).

B und C): Beispiele genomischer Heterogenität innerhalb einer einzelnen bzw. zwischen klinisch verwandten Entitäten. B zeigt die Imbalance-Histogramme von jeweils 23 sporadischen kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) und ohne Instabilität (MSS). In C wird die Verteilung genomischer Imbalancen in Plattenepithel- und Adenokarzinomen des Ösophagus gegenübergestellt. Bei den Plattenepithelkarzinomen ist die häufig beobachtete fokale Amplifikation auf 11q13 hervorgehoben, welche den für Cyclin D1 kodierenden *CCND1*-Genort einschließt (roter Pfeil).



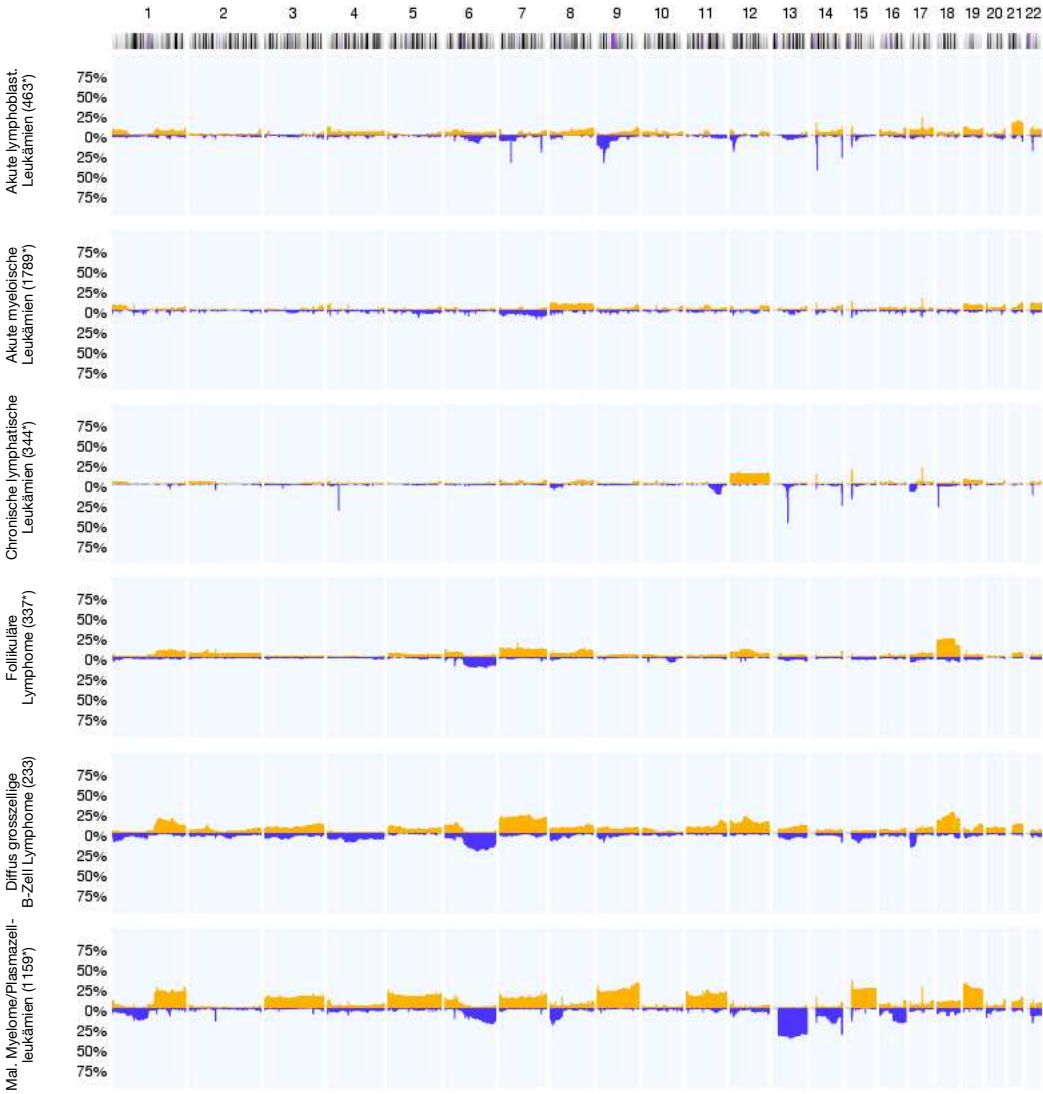
A

Aussmass genomischer Imbalancen in verschiedenen Neoplasietypen

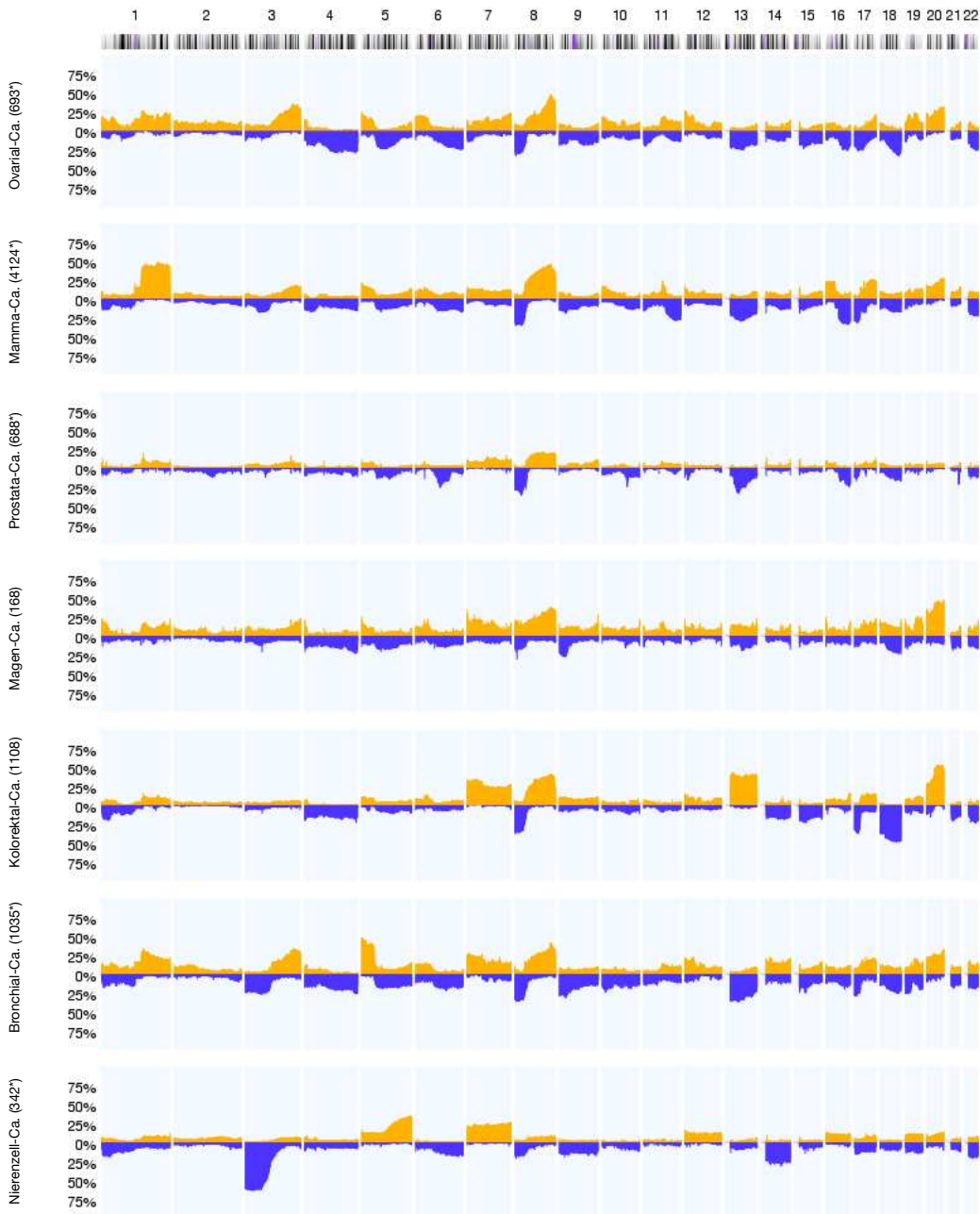


B

Beispiele für genomische Duplikations-/Deletionsmuster in hämatologischen Neoplasien

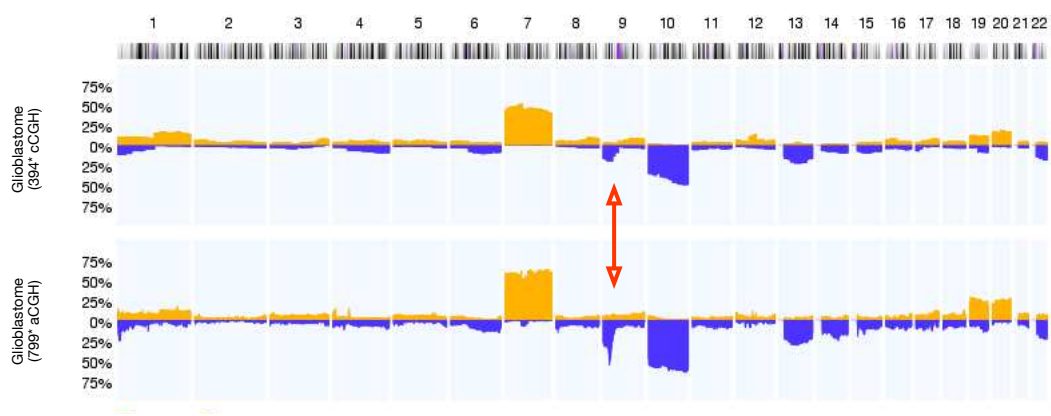


Beispiele für genomische Duplikation-/Deletionsmuster in häufigen Karzinomentitäten



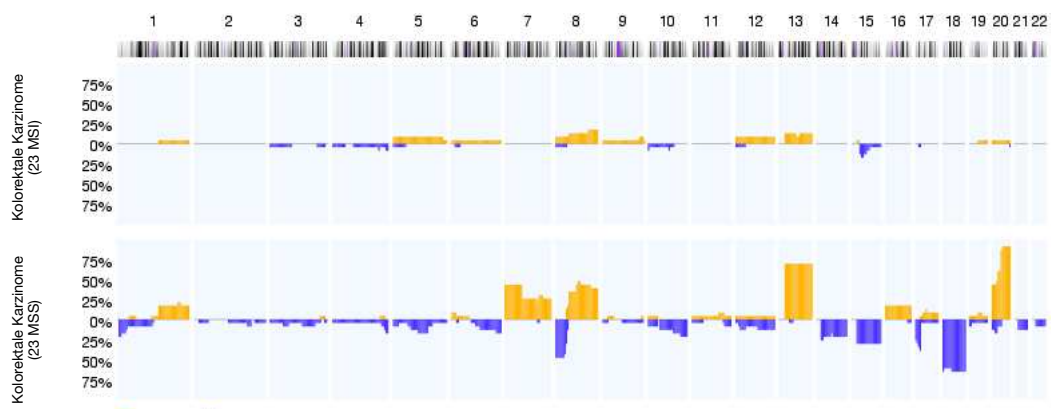
A

**Verbesserte Auflösung in genomischen Arrays vs. chromosomaler CGH:
Fokale 9p-Deletionen in Glioblastomen (CDKN A/B Locus)**



B

Beispiele für genomische Heterogenität klinisch verwandter Entitäten



C

